



(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 199 40 389 A 1**

(5) Int. Cl.⁷:
C 07 C 279/18
C 07 C 311/06
A 61 K 31/27
A 61 K 31/155
A 61 K 31/18
A 61 K 31/33
C 07 D 521/00
C 07 C 323/29
C 12 N 9/99
A 61 P 35/00

DE 199 40 389 A 1

(21) Aktenzeichen: 199 40 389.9
(22) Anmeldetag: 25. 8. 1999
(43) Offenlegungstag: 1. 3. 2001

(71) Anmelder:
Wilex Biotechnology GmbH, 81675 München, DE
(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

(72) Erfinder:
Magdolen, Viktor, Dr., 85551 Kirchheim, DE;
Moroder, Luis, Prof.Dr., 82152 Planegg, DE; Sperl,
Stefan, Dipl.-Chem., 82049 Pullach, DE;
Stürzebecher, Jörg, Dr., 99094 Erfurt, DE; Wilhelm,
Olaf, Dr., 81545 München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Selektive Inhibitoren des Urokinase-Plasminogen Aktivators
(57) Die vorliegende Erfindung betrifft neue selektive Inhibitoren des Urokinase-Plasminogenaktivators (uPA, EC 3.4.21.31) vom Arylguanidintyp.

DE 199 40 389 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue selektive Inhibitoren des Urokinase-Plasminogenaktivators (uPA, EC 3.4.21.31) vom Arylguanidintyp.

5 Der Plasminogenaktivator von Urokinase-Typ (uPA) spielt eine Schlüsselrolle bei der Tumorzersetzung und Metastasenbildung (Schmitt et al., J. Obst. Gyn. 21 (1995), 151–165). uPA wird in verschiedenen Arten von Tumorzellen überexprimiert (Kwaan, Cancer Metastasis Rev. 11 (1992), 291–311) und bindet an den Tumorassoziierten uPA-Rezeptor (uPAR), wo die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin stattfindet. Plasmin ist in der Lage, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV abzubauen. Es aktiviert auch einige andere 10 ECM-abbauende Enzyme, insbesondere Matrix-Metalloproteininasen. Hohe Mengen an Tumorassoziiertem uPA korrelieren mit einem höheren Metastasierungsrisiko für Krebspatienten (Stephens et al., Breast Cancer Res. & Treat. 52 (1998), 99–111). Eine Hemmung der proteolytischen Aktivität von uPA ist daher ein guter Ansatzpunkt für eine anti-metastatische Therapie.

Ein gemeinsames Merkmal vieler bekannter synthetischer uPA-Inhibitoren ist ein basischer Rest, der Amidino- oder

15 Guanidino-Gruppen enthält, und an Asp¹⁸⁹ in der S1-Spezifitätstasche von uPA binden kann und dort als Arginin-Mimetikum wirkt (Spraggan et al., Structure 3 (1995), 681–691). Die meisten der bekannten Inhibitoren sind jedoch nicht selektiv für uPA, sondern hemmen auch andere Serinproteasen wie Trypsin, Thrombin, Plasmin oder Gewebs-Plasminogenaktivator (tPA).

p-Aminobenzamidin ist ein moderat selektiver uPA-Inhibitor mit einer Hemikonstante von 82 µM. Billstroem et al.

20 (Int. J. Cancer 61 (1995), 542–547) konnten eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate von DU145 Tumoren (eine Prostata-Adenokarzinom-Zelllinie) in SCID Mäusen bei oraler Verabreichung in einer Tagesdosis von 125 bis 250 mg p-Aminobenzamidin/kg/Tag zeigen. Die Nebenwirkungen waren vernachlässigbar gering.

Einige monosubstituierte Phenylguanidine haben sich als wirksame und selektive uPA Inhibitoren in vitro erwiesen. Diese kleinen Moleküle zeigen Inhibitionskonstanten im Mikromolarbereich, sie binden jedoch nur in der S1 Tasche

25 von uPA (Yang et al., J. Med. Chem. 33 (1990), 2956–2961). Biologische Untersuchungen mit diesen Verbindungen wurden nicht durchgeführt.

Das Diuretikum Amilorid ist ein selektiver uPA-Inhibitor (K_i , uPA = 7 µM), der die Bildung von Lungenmetastasen nach i. v. Inokulation von Ratten-Brustadenokarzinomzellen verhindert (Kelen et al., Anticancer Res. 8 (1988), 1373–1376). Einige Derivate von 3-Amidino-phenylalanin haben sich ebenfalls als wirksame Inhibitoren von Serinproteasen erwiesen, diese Verbindungen weisen jedoch im allgemeinen nur eine geringe Selektivität für uPA auf (Stürzebecher et al., J. Med. Chem. 40 (1997), 3091–3099; Stürzebecher et al., J. Enzyme Inhib. 9 (1995), 87–99).

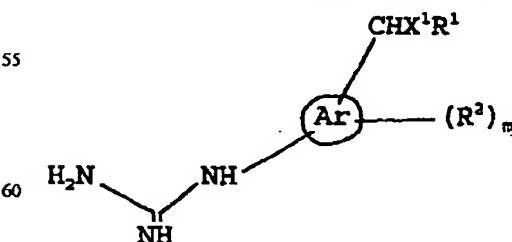
Die derzeit wirksamsten und selektivsten uPA-Inhibitoren sind Derivate von Benzo[b]thiophen-2-carboxamidin (B428 und B623: K_i , uPA = 0,32 bzw. 0,07 µM; US-Patent 5,340,833). Rabbani et al. (Int. J. Cancer 63 (1995), 840–845) sowie King et al. (Cancer Res. 57 (1997), 3585–3593) konnten nach Verabreichung von 4-Iod-benzo[b]-thiophen-2-carboxamidin (B428) eine Abnahme des Tumorwachstums und der Metastasenbildung in einem syngenen Modell für Ratte-Prostatakarzinom bzw. Maus-Mammakarzinom zeigen. Letztere Untersuchungen zeigten eine weitere Abnahme des Primärtumorwachstums bei gemeinsamer Verabreichung von B428 mit dem Antiöstrogen Tamoxifen.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, neue selektive uPA-Inhibitoren bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch neue Arylguanidin- und insbesondere Phenylguanidin-Derivate gelöst. Diese Verbindungen enthalten einen weiteren Substituenten am aromatischen Ringsystem, vorzugsweise in Para-Position zur Guanidinogruppe, der eine gegebenenfalls substituierte Methylengruppe gefolgt von Wasserstoffdonor/Akzeptorfunktionalitäten enthält. Aufgrund dieses Substitutionsmusters weisen die Verbindungen eine besonders hohe Wirksamkeit und Selektivität für uPA auf. Diese Wirksamkeit könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß sie

45 (1) als Arginin-Mimetikum mit dem Aminosäurerest Asp¹⁸⁹ in der S1-Tasche von uPA wechselwirken und
 (2) eine Wechselwirkung mit der S2- und/oder S3-Tasche von uPA eingehen können.

N-substituierte p-Aminophenylguanidine (ohne Methylenspacer) sowie Derivate von p-Guanidino-phenylalanin (2 Methylene Gruppen als Spacer) waren als uPA-Inhibitoren unwirksam. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen 50 Verbindungen Urethan- oder Harnstoffgruppen für eine Wechselwirkung mit S2 und/oder große hydrophobe Reste wie Arylgruppen oder Cycloalkylgruppen (z. B. Adamantan) für eine Wechselwirkung mit S3.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

65 Ar ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem bedeutet,
 X¹ NR³R⁴, OR³, SR³, COOR³, CONR³R⁴ oder COR³ bedeutet,
 R¹ H, einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest oder COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵ bedeutet,

DE 199 40 389 A 1

R² Halogen, C(R⁶)₃, C₂(R⁶)₅, OC(R⁶)₃ oder OC₂(R⁶)₅ bedeutet,

R³ H oder einen beliebigen organischen Rest bedeutet,

R⁴ H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylrest bedeutet,

R⁵ H, einen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Carboxy-alkyl-, Carboxy-alkenyl-, Carboxy-alkinyl-, Carboxy-aryl- oder Carboxy-heteroarylrest bedeutet, wobei die Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- und Heteroarylreste gegebenenfalls substituiert sein können,

R⁶ jeweils unabhängig H oder Halogen, insbesondere F, ist und

in eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist,

oder Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels zur Hemmung des Urokinase-Plasminogenaktivators.

Die Verbindungen können als Salze, vorzugsweise als physiologisch verträgliche Säuresalze, z. B. als Salze von Mineralsäuren, besonders bevorzugt als Hydrochloride oder als Salze von geeigneten organischen Säuren vorliegen. Die Guanidiniumgruppe kann gegebenenfalls Schutzfunktionen tragen, die vorzugsweise unter physiologischen Bedingungen abspaltbar sind. Die Verbindungen können als optisch reine Verbindungen oder als Gemische von Enantiomeren oder/und Diastereoisomeren vorliegen.

In den Verbindungen der allgemeinen Formel (I) ist Ar vorzugsweise ein aromatisches oder heteroaromatisches Ring- system mit einem einzigen Ring, insbesondere ein Benzolring. In diesem Ringsystem sind die Substituenten CHX¹R¹ und NHC(NH)NH₂ vorzugsweise in Meta- oder Para-Position und besonders bevorzugt in Para-Position zueinander angeordnet. Darüber hinaus kann Ar noch weitere von Wasserstoff verschiedene Substituenten R² enthalten. Vorzugsweise ist die Anzahl der Substituenten R² 0, 1, 2 oder 3, besonders bevorzugt 0 oder 1 und am meisten bevorzugt 0. Bevorzugte Beispiele für R² sind Halogenatome (F, Cl, Br oder I), CH₃, CF₃, OH, OCH₃ oder OCF₃.

Für die Inhibitoraktivität kritisch ist der Substituent -CHX¹R¹. R¹ kann H oder ein gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest sein. Der Alkylrest kann eine geradkettige oder verzweigte C₁-C₁₀-Alkylgruppe, insbesondere eine C₁-C₄-Alkylgruppe, oder eine C₃-C₈-Cycloalkylgruppe sein, die beispielsweise mit C₁-C₃-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Amino, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen aber auch mit Aryl- oder Heteroarylresten substituiert sein kann. Alkenyl- und Alkinylreste sind vorzugsweise C₂-C₁₀-Gruppen, insbesondere C₂-C₄-Gruppen, die gegebenenfalls wie zuvor angegeben substituiert sein können. Aryl- und Heteroarylreste können beispielsweise mit C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₃-Alkoxy-Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano oder/und Oxo substituiert sein. Weiterhin kann R¹ die Bedeutungen COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵ aufweisen.

Die Gruppe X¹ ist ein Rest mit Elektronendonator- oder/und Elektronenakzeptor-Eigenschaften, vorzugsweise NR³R⁴, OR³, SR³, COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵. Besonders bevorzugt ist X¹ NR³R⁴. R³ kann ein beliebiger organischer Rest oder Wasserstoff sein. R⁴ kann Wasserstoff oder ein gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylrest sein, wie zuvor angegeben.

R⁵ kann Wasserstoff, ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Carboxy-alkyl-, Carboxy-alkenyl-, Carboxy-alkinyl-, Carboxy-aryl- oder Carboxy-heteroaryl-Rest sein. Vorzugsweise ist R⁵ ein raumfüllender Rest und enthält mindestens eine Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl- oder/und tert.-Alkylgruppe. Besonders bevorzugt sind Phenylreste, substituierte Phenylreste, tert. Alkylreste und Cycloalkylreste, die gegebenenfalls Substituenten wie vorstehend definiert enthalten können.

Wenn X¹ die Bedeutung NR³R⁴ hat und R³ und R⁴ jeweils unabhängig Wasserstoff oder gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl- oder Heteroarylreste (siehe Definition für R¹) darstellen, weist R⁴ vorzugsweise eine von Wasserstoff verschiedene Bedeutung, besonders bevorzugt COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵, insbesondere COOR³, CONH₂, CO-COOR⁵ oder CHO auf, so daß die Verbindungen I Derivate von Guanidino-Phenylglycin sind.

Besonders bevorzugt ist R³ eine Gruppe der allgemeinen Formel (II):



worin

X² NH, NR⁴, O oder S bedeutet,

X³ NH, NR⁴, O, S, CO, COO, CONH oder CONR⁴ bedeutet,

Y C(R⁸)₂ bedeutet,

R⁴ wie in Formel (I) definiert ist,

R⁷ H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest oder -SO₂-R⁹ bedeutet,

R⁸ jeweils unabhängig H, Halogen oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl- oder Aryl- oder/ und Heteroarylrest bedeutet,

R⁹ H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest bedeutet und n eine ganze Zahl von 0 bis 2 ist.

X² ist vorzugsweise NH oder O, besonders bevorzugt O. X³ ist vorzugsweise NH oder -O-. Y ist vorzugsweise CH₂ oder CHR⁸, wobei R⁸ vorzugsweise wie R⁴ in Formel (I) definiert ist.

R⁷ und R⁹ sind vorzugsweise wie R⁵ in Formel (I) definiert.

Am meisten bevorzugt ist R³ eine Gruppe der allgemeinen Formeln IIIa, IIIb oder IIIc:

5

10

15

20

25

30

35

40

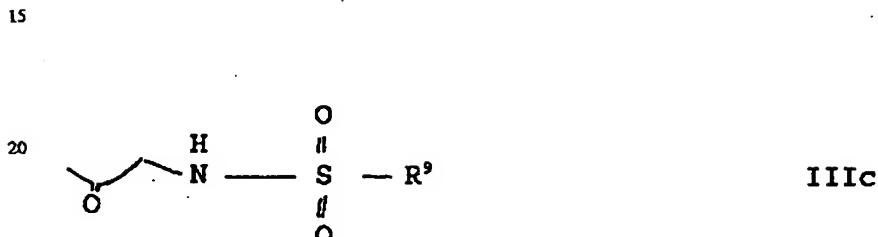
45

50

55

60

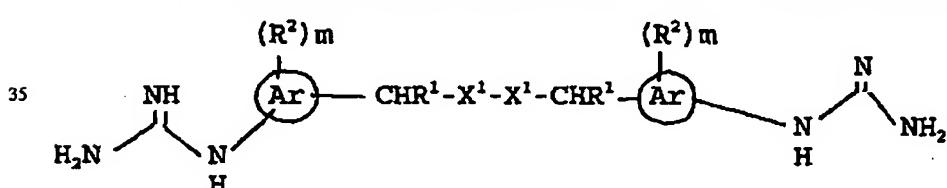
65



25 worin R⁷ und R⁹ wie in Formel (II) definiert sind.

Die Substituenten R⁷ und R⁹ enthalten – ebenso wie R⁵ – vorzugsweise raumfüllende Gruppen, die ausgewählt sein können aus gegebenenfalls substituierten Arylresten, insbesondere Phenyl- und substituierten Phenylresten und gegebenenfalls substituierten verzweigten Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylresten, insbesondere mit tertiären C-Atomen wie tert-Butyl oder Neopentyl oder gegebenenfalls substituierten Cycloalkylresten, insbesondere Bi- oder Tricycloalkylresten wie Adamantyl.

30 Eine besonders hohe Affinität und Selektivität für uPA haben auch Verbindungen der allgemeinen Formel (IV):



40 worin Ar, X¹, R² und m unabhängig bei jedem Vorkommen gleich oder verschieden sein können und eine Bedeutung wie in den Formeln (I), (II) und (IIIa-c) definiert besitzen.

Die Verbindungen der Formel (IV) enthalten zwei Arylguanidinogruppen und sind über ihre Substituenten CHR¹X¹, die jeweils gleich oder verschieden sein können, miteinander verknüpft.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können beispielsweise ausgehend von p-Amino-benzylamin gemäß den in den Fig. 1 und 2 gezeigten Reaktionsschemata hergestellt werden. 4-Amino-benzylamin kann beispielsweise mit einem Schutzreagenz für Aminogruppen, z. B. Diert-butyl-pyrocarbonat zu einem geschützten Zwischenprodukt 4-(N-Boc-Aminomethyl)-anillin (1) umgesetzt werden, wobei Boc tert-Butyloxycarbonyl bedeutet. Die aromatische Amino-funktion dieser Verbindung kann mit einem Guanidinylierungsreagenz, z. B. N,N'-di-Z-N"-triflylguanidin umgesetzt werden, wobei 1-[4-(N-Boc-aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidin (2) entsteht, wobei Z Benzoyloxycarbonyl bedeutet. Diese Verbindung kann durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zu 1-[4-(Aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidinium-hydrochlorid (4) umgesetzt werden. Die Verbindung (4) kann wiederum mit reaktiven Verbindungen wie etwa Chlorameisensäureestern, Isocyanaten oder N-Hydroxysuccinimidestern zu den gewünschten Endprodukten umgesetzt werden.

Die Darstellung hydrierungslabiler Verbindungen ist in Fig. 2 beschrieben. 4-Amino-benzylamin kann mit einem Schutzreagenz für Aminogruppen, z. B. Benzoyloxycarbonyloxysuccinimid zu einem geschützten Zwischenprodukt (6) und dann mit einem weiteren Guanidinylierungsreagenz, z. B. N,N'-di-Boc-1-guanylpyrazol zu (7) umgesetzt werden. Diese Verbindung kann zu (8) hydriert und anschließend mit reaktiven Verbindungen zu den gewünschten Endprodukten umgesetzt werden.

Auf entsprechende Weise können auch Verbindungen synthetisiert werden, bei denen X¹ die Bedeutung OR³, SR³, COOR³, CONR³R⁴ oder COR³ hat.

Die erfundungsgemäßen Urokinaseinhibitoren können gegebenenfalls zusammen mit geeigneten pharmazeutischen Hilfs- oder Trägerstoffen zur Herstellung von Arzneimitteln oder in der Diagnostik verwendet werden. Dabei ist eine Verabreichung in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z. B. anderen Urokinaseinhibitoren wie etwa Antikörpern oder Peptiden möglich.

65 Die Arzneimittel können bei Menschen und Tieren topisch, oral, rektal oder parenteral, z. B. subkutan oder intravenös, z. B. in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflaster, verabreicht werden.

Die erfundungsgemäßen Verbindungen sind zur Bekämpfung von Krankheiten geeignet, die mit einer pathologischen

DE 199 40 389 A 1

Überexpression von uPA oder/und uPAR assoziiert sind. Sie sind beispielsweise in der Lage, hocheffizient das Wachstum oder/und die Ausbreitung der malignen Tumoren sowie die Metastasierung von Tumoren zu hemmen. Dabei können die uPA-Inhibitoren gegebenenfalls zusammen mit anderen Tumormitteln oder mit anderen Behandlungsarten, z. B. Bestrahlung oder chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden. Weiterhin sind die erfundungsgemäßen Inhibitoren auch für andere uPA-assoziierte Erkrankungen wirksam.

Erfundungsgemäße uPA-Inhibitoren sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens einen zweifach, vorzugsweise mindestens einen fünffach und besonders bevorzugt einen mindestens zehn- und bis zu 1000-fach geringeren K_i -Wert für uPA gegenüber tPA aufweisen. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die erfundungsgemäßen Verbindungen die Blutgerinnung nur geringfügig beeinflussen, da sie für eine effektive Hemmung von Thrombin, Plasmin und Faktor Xa zu hohe K_i -Werte haben.

Die erfundungsgemäßen Substanzen der Formel (I) können in Form von Konjugaten mit physiologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, z. B. mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Mitteln, z. B. Chemotherapeutika wie cis-Platin oder 5-Fluor-uracil, oder Peptiden. Weiterhin können die Substanzen auch in die Membran von Trägervesikeln, z. B. Liposomen, eingebaut werden und somit ein Targeting von in den Trägervesikeln eingeschlossenen Wirksubstanzen, z. B. zytotoxischen Mitteln, wie etwa Doxorubicin, ermöglichen.

Durch die Erfahrung wird ein Verfahren zur Urokinaschemmung bei Lebewesen, insbesondere bei Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) bereitgestellt. Die Dosierung der Verbindung liegt üblicherweise im Bereich von 0,01 bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Die Dauer der Behandlung hängt von der Schwere der Erkrankung ab und kann von einer einmaligen Gabe bis zu einer mehrwöchigen oder sogar mehrmonatigen Behandlung, die gegebenenfalls in Intervallen wiederholt werden kann, reichen.

Schließlich betrifft die Erfahrung neue Aryl-Guanidinderivate der allgemeinen Formel (I).

Die Erfahrung soll an den folgenden Beispielen und Abbildungen näher erläutert werden. Es zeigt

Fig. 1 ein allgemeines Reaktionsschema zur Herstellung erfundungsgemäßer hydrierungsstabiler Substanzen.

Fig. 2 ein allgemeines Reaktionsschema zur Herstellung erfundungsgemäßer hydrierungslabiler Substanzen.

Beispiele

Material und Methoden

Alle für die Synthese von uPA-Inhibitoren verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien waren von der höchsten kommerziell verfügbaren Qualität und wurden – sofern erforderlich – durch Standardmethoden weiter aufgereinigt und getrocknet. Die analytische HPLC erfolgte auf Nucleosil 100/C18 Säulen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) unter Verwendung eines linearen Acetonitril/2% H_3PO_4 Gradienten (von 5 : 95 bis 90 : 10 in 13 min) ESI-MS-Spektren wurden auf einem Perkin Elmer API 165 Massenspektrometer gemessen.

Beispiel 1

Synthese von säurelabilen Urethanen, z. B. 4-(N-Boc-aminomethyl)-phenylguanidin (3)

4-(N-Boc-aminomethyl)-anilin (1)

4-Amino-benzylamin (2 ml; 17,6 mmol) wurde in 1,4-Dioxan (10 ml) gelöst. Unter Rühen wurde eine wässrige 2 N NaOH-Lösung (17,6 ml; 35,2 mmol) zugegeben. Eine Lösung von Di-tert-butyl-pyrocarbonat (3,08 g; 14,1 mmol) in 1,4-Dioxan (30 ml) wurde tropfenweise über 30 min zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum auf etwa 10 ml konzentriert und zweimal mit Ethylacetat (30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässrigem 5% $KHSO_4$ (10 ml), wässrigem 5% $NaHCO_3$, Wasser und Salzlösung gewaschen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft, wobei das Produkt als hellgelbe Festsubstanz erhalten wurde.

Ausbeute: 2,38 g (76%); HPLC: t_R 5,6 min. MS 223 ($M+H$)⁺, berechnet 222 (M).

1-[4-(N-Boc-aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidin (2)

Eine Lösung der Verbindung (1) (500 mg; 2,24 mmol) und N,N'-di-Z-N"-triflylguanidin (1,04 g; 2,24 mmol) (Feichtinger et al., J. Org. Chem. 63 (1998) 3804–3805) in 5 ml Aceton wurde bei Raumtemperatur heftig gerührt. Nach 10 min begann das Produkt in Form eines Präzipitats auszufallen. Nach 2 h wurde das Produkt abfiltriert, im Vakuum getrocknet und aus Methanol umkristallisiert, wobei weiße Kristalle erhalten wurden.

Ausbeute: 1,065 g (89%); HPLC: t_R 13,4 min. MS 533 ($M+H$)⁺, berechnet 532 (M).

4-(Boc-aminomethyl-phenylguanidinium-hydrochlorid (3)

50 mg (0,107 mmol) der Verbindung (2) wurden in 5 ml Methanol gelöst, gerührt und für 3 h über einem 10% Palladium-Aktivkohle-Katalysator hydriert. Nach Entfernung des Katalysators durch Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde aus Methanol/Diisopropylether nach Zugabe von einem Äquivalent HCl in 1,4-Dioxan umkristallisiert.

Ausbeute: 28 mg (87%); HPLC, t_R 7,1 min. MS 265 ($M+H$)⁺, berechnet 264 (M).

DE 199 40 389 A 1

Beispiel 2

Synthese von disubstituierten Harnstoffen unter Verwendung von 1-[4-(Aminomethyl-phenyl]-2,3-di-Z-guanidinium-hydrochlorid (4) als Baustein, z. B. 4-[3-(1-Adamantyl)-ureido]-phenyl-guanidinium-hydrochlorid (5)

5

1-[4-(Aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidinium-hydrochlorid (4)

1 g (1,878 mmol) der Verbindung (2) wurde in 20 ml 3 N HCl (Gas) in 1,4-Dioxan bei 0°C gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde das kristalline Produkt in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten.

10

Ausbeute: 872 mg (99%); HPLC: t_R 10,2 min. MS 433 (M+H)⁺, berechnet 432 (M).

4-[3-(1-Adamantyl)-ureido]-phenyl-guanidinium-hydrochlorid (5)

15 50 mg (0,107 mmol) der Verbindung (4), 17 mg (0,107 mmol) Adamantyl-isocyanat und 45 µl (0,32 mmol) Triethylamin wurden in 1 ml Ethylenchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) gelöst und dreimal mit 0,1 N wässriger HCl extrahiert. Die organische Phase wurde bis zu Trockene eingedampft. Die Entfernung der Z-Schutzgruppen erfolgte wie für Verbindung (3) beschrieben.

20

Ausbeute: 15 mg (37%); HPLC: t_R 8,6 min. MS 342 (M+H)⁺, berechnet 341 (M).

Beispiel 3

Synthese von hydrierungslabilen Verbindungen, z. B. 4-[N-(4-Nitrobenzyloxycarbonyl)-aminomethyl]-phenylguanidin (9)

25

4-(N-Z-Aminomethyl)-anilin (6)

4-Amino-benzylamin (1 ml; 8,82 mmol) wurde in 10 ml 1,4-Dioxan gelöst. Eine wässrige 2 NaOH Lösung von NaOH (8,8 ml; 17,64 mol) wurde unter Rühren zugegeben. Dann wurde eine Lösung von Benzyloxycarbonyloxy succinimid (1,978 g; 7,938 mmol) in 10 ml 1,4-Dioxan tropfenweise über 15 min zugegeben, und das Reaktionsgemisch für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum auf etwa 10 ml konzentriert und zweimal mit 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger 5%iger NaHCO₃ Lösung, Wasser und Salzlösung gewaschen, über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, eingedampft und im Vakuum getrocknet, wobei das Produkt als hellgelbe Festsubstanz erhalten wurde.

35

Ausbeute: 1,8 g (88%); HPLC: t_R 6,8 min. MS 257 (M+H)⁺, berechnet 256 (M).

1-[4-(N-Z-Aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Boc-guanidin (7)

40 Eine Lösung von 495 mg (1,93 mmol) der Verbindung (6) und 599 mg (1,93 mmol) N,N'-di-Boc-1-guanylpyrazol (Bernatowicz et al., Tetrahedron Lett. 34 (1993), 3389–3392) in 5 ml Aceton wurde für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 50 ml Diethylether gelöst, mit wässriger 5% KHSO₄ Lösung, Wasser und Salzlösung gewaschen und über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdampfen des Diethylethers im Vakuum wurde ein hellgelber Schaum erhalten.

45

Ausbeute: 670 mg (70%); HPLC: t_R 12,1 min. MS 499 (M+H)⁺, berechnet 498 (M).

1-(4-Aminomethyl)-phenyl-2,3-di-Boc-guanidin-hydrochlorid (8)

50 Die Verbindung (8) wurde durch katalytische Hydrierung von 600 mg (1,2 mmol) der Verbindung (7) in Ethanol über einem 10% Palladium-Aktivkohle-Katalysator für 1 h erhalten. Nach Filtration des Katalysators wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft, wobei ein Öl erhalten wurde, das aus Isopropanol/Diisopropylether nach Zugabe von 1 Äquivalent HCl in 1,4-Dioxan umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 450 mg (91%); HPLC: t_R 8,1 min. MS 365 (M+H)⁺, berechnet 364 (M).

55

4-[N-(4-Nitrobenzyloxycarbonyl)-aminomethyl]-phenylguanidin-hydrochlorid (9)

Eine Lösung von 50 mg (0,125 mmol) der Verbindung (8), 27 mg (0,125 mmol) 4-Nitrobenzylchlorformiat und 52 µl (0,375 mmol) Triethylamin in 1 ml Methylenchlorid wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 30 ml Ethylacetat aufgelöst und dreimal mit 0,5 N wässriger HCl gewaschen.

60

Nach Abdampfen des Ethylacetats wurde der Rückstand in 95% Trifluoressigsäure gelöst und für 1 h gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde das Produkt aus Ethanol/Diisopropylether umkristallisiert.

Ausbeute: 35 mg (60%); HPLC: t_R 8,1 min. MS 344 (M+H)⁺, berechnet 343 (M).

Beispiel 4

65

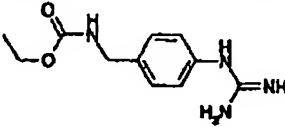
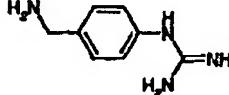
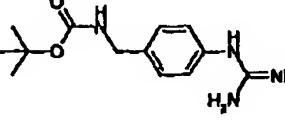
In vitro Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen der Formel I

Zur Bestimmung der uPA Inhibitoraktivität wurden 200 µl Tris-Puffer (0,05 mol/l, den Inhibitor enthaltend,

DE 199 40 389 A 1

0,154 mol/l NaCl, 5% Ethanol, pH 8,0), 25 µl Substrat (Pefachrome UK oder BZ-β-Ala-Gly-Arg-pNA in H₂O; Pentapharm LTD, Basel, Schweiz) und 50 µl sc-Urokinase (Ribosepharm GmbH, Haan, Deutschland), bzw. eine entsprechende andere Protease bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels eines Mikroplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K_i-Werte wurden nach Dixon durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K_i-Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen, die Standardabweichung lag unter 25%. Die getesteten Inhibitoren und ihre Inhibitionskonstanten für verschiedene Proteasen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

Inhibitor	Name	uPA	K _i [µM] Plasmin	K _i [µM] Thrombin	K _i [µM] Trypsin	K _i [µM] FXa
	ST 269	27	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 270	46	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 242	36	>1000	>1000	>1000	>1000

10

15

20

25

30

35

40

45

50

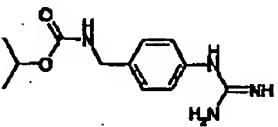
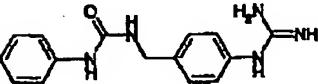
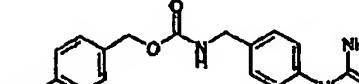
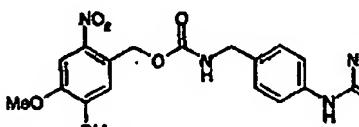
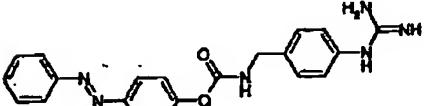
55

60

65

DE 199 40 389 A 1

	Inhibitor	Name	uPA	Plasmin	KI [µM] Thrombin	Trypsin	FXa
5		ST 274	13	>1000	>1000	>1000	>1000
10		ST 293	2,4	>1000	600	46	>1000
15		ST 282	240	>1000	>1000	>1000	>1000
20		ST 267 *	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
25		ST 296	22	>1000	>1000	42	>1000
30		ST 294	37	>1000	>1000	>1000	>1000
35		ST 298	42	>1000	>1000	37	>1000
40		ST 270	46	>1000	>1000	>1000	>1000
45		ST 271	51	>1000	>1000	>1000	>1000
50		ST 275	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
55							
60							
65							

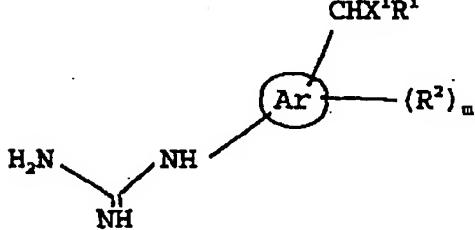
Inhibitor	Name	uPA	Plasmin	Ki [µM] Thrombin	Trypsin	F Xa
	ST 273	52	130	>1000	>1000	>1000
	ST 301	29	170	>1000	>1000	330
	ST 311	12	???	>1000	200	>1000
	ST 312	2,8	???	>1000	100	>1000
	ST 313	35	???	>1000	???	>1000
	ST 315	11	???	>1000	200	>1000

Die Verbindungen ST293, 312 und 315 weisen einen Ki-Wert für uPA von > 1000 µm auf.

Die als ST293 und ST312 bezeichneten Verbindungen erwiesen sich als besonders wirksame und selektive Inhibitoren.

Patentansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

Ar ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem bedeutet,
 $X^1 NR^3R^4$, OR^5 , SR^6 , $COOR^7$, $CONR^3R^4$ oder COR^5 bedeutet,

R^1 H, einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest, oder $COOR^3$, $CONR^3NR^4$ oder COR^5 bedeutet

R^2 Halogen, $C(R^6)_3$, $C_2(R^6)_5$, $OC(R^6)_3$ oder $OC_2(R^6)_5$ bedeutet,

R^3 H oder einen beliebigen organischen Rest bedeutet,

R^4 H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinyl-Rest bedeutet,

R^5 H, einen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Carboxy-alkyl-, Carboxy-alkenyl-, Carboxy-alkinyl-, Carboxy-aryl- oder Carboxy-heteroarylrest bedeutet wobei die Alkyl-, Aryl- und Heteroarylreste gegebenenfalls substituiert sein können,

R^6 jeweils unabhängig H oder Halogen, insbesondere F, ist und m eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist,

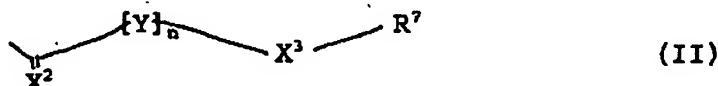
DE 199 40 389 A 1

oder Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels zur Hemmung des Urokinase-Plasminogenaktivators.

2. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1, worin Ar einen Benzolring bedeutet.

3. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 2, worin die Substituenten -CH₂R¹ und -NHC(NH)NH₂ in para-Position zueinander angeordnet sind.

4. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R³ eine Gruppe der allgemeinen Formel II bedeutet:



worin

X² NH, NR⁴, O oder S bedeutet,

X³ NH, NR⁴, O, S, CO, COO, CONH oder CONR⁴ bedeutet,

Y C(R⁸)₂ bedeutet,

R⁴ wie in Anspruch 1 definiert ist,

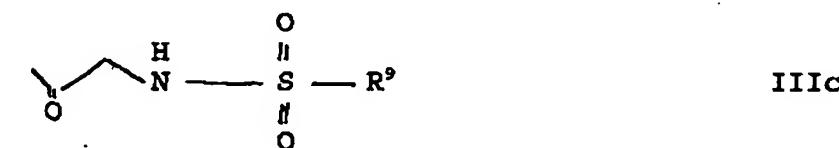
R⁷ H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest oder -SO₂-R⁹ bedeutet,

R⁸ jeweils unabhängig H, Halogen oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest bedeutet,

R⁹ H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest bedeutet und

n eine ganze Zahl von 0 bis 2 ist.

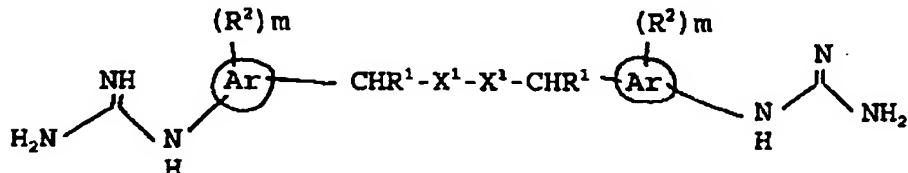
5. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin R³ eine Gruppe der allgemeinen Formel IIIa, IIIb oder IIIc bedeutet:



worin R⁷ und R⁹ wie in Anspruch 4 definiert sind.

6. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 oder 5, worin R⁷ und R⁹ ausgewählt sind aus gegebenenfalls substituierten Aryl-, insbesondere Phenyl- und substituierten Phenylresten, und gegebenenfalls substituierten tertiären Alkylresten oder Cycloalkylresten, insbesondere Bicycloalkylresten wie Adamantyl.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen die allgemeine Formel IV aufweisen:



60 worin Ar, X¹, R² und m unabhängig bei jedem Vorkommen gleich oder verschieden sein können und eine Bedeutung wie in Anspruch 1 definiert besitzen.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Bekämpfung von Krankheiten, die mit einer pathologischen Überexpression von Urokinase oder/und Urokinase-Rezeptor assoziiert sind.

9. Verwendung nach Anspruch 8 zur Tumorbekämpfung.

10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9 zur Bekämpfung der Metastasenbildung.

11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von oral, topisch, rektal oder parenteral verabreichbaren Arzneimitteln.

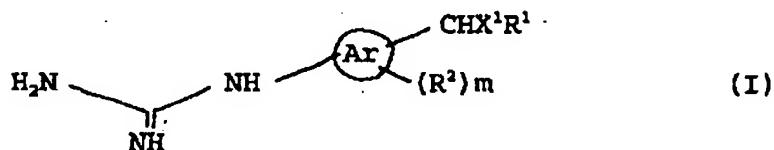
DE 199 40 389 A 1

12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen wie Pflastern.

5

13. Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

14. Verbindungen der Formel (I)



10

worin Ar, X¹, R¹, R² und m wie in einem der Ansprüche 1 bis 7 definiert sind.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

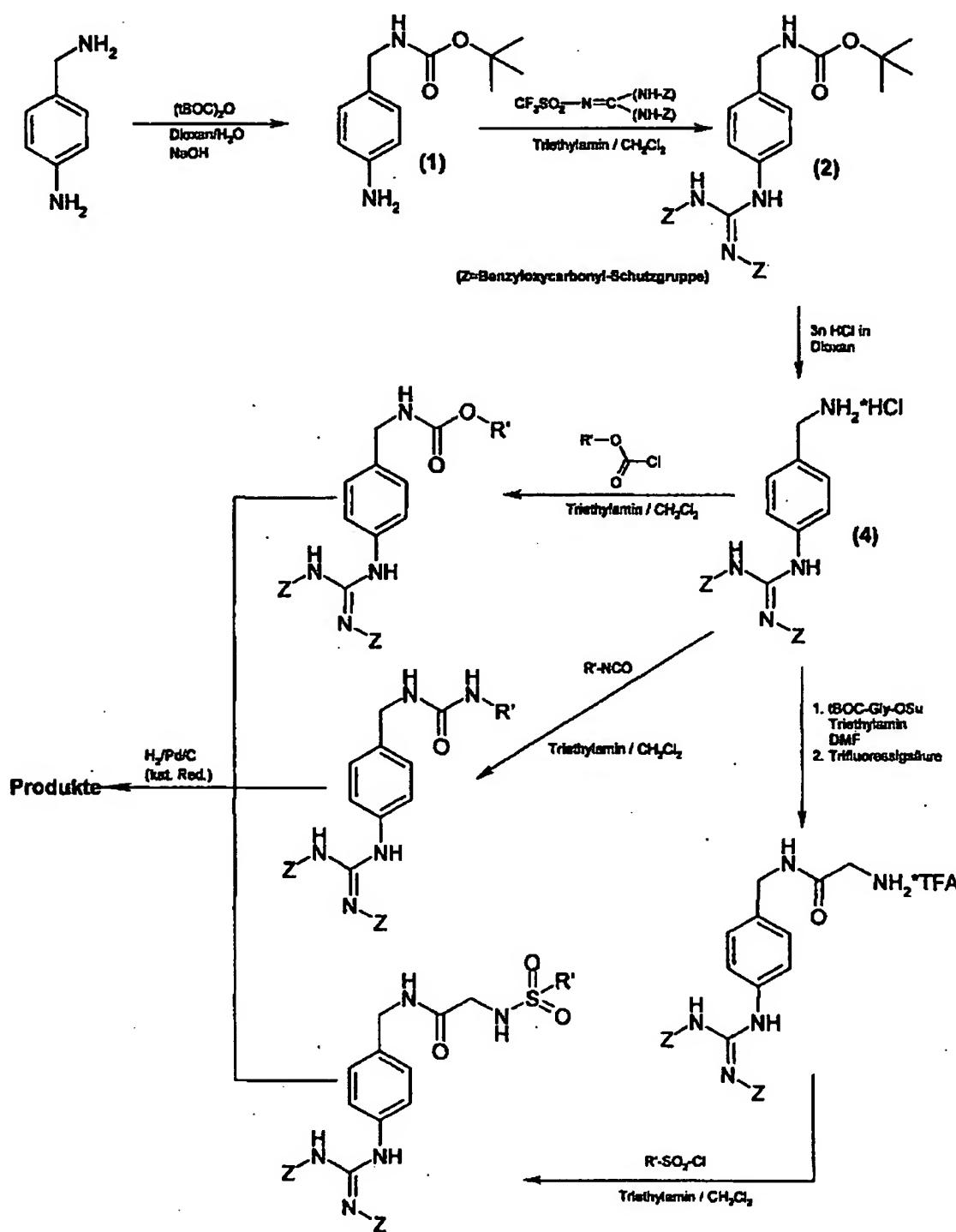
60

65

- Leerseite -

Figur 1

Synthese der hydrierungsstabilen Verbindungen:



Figur 2

Synthese der hydrierungslabilen Verbindungen:

